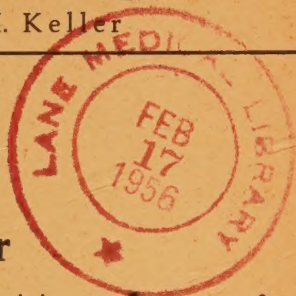


**Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Hochschule in Gießen**

Direktor: Professor Dr. H. Keller



**Beitrag zur
Typendifferenzierung des *Mycobacterium
tuberculosis* var. *hominis* und var. *bovis*.**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Veterinär - Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig - Hochschule zu Gießen

vorgelegt von
Wolfgang Schneider
Tierarzt aus Janowitz O. S.

GIESSEN 1955

**Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Hochschule in Gießen**

Direktor: Professor Dr. H. Keller

**Beitrag zur
Typendifferenzierung des *Mycobacterium
tuberculosis* var. *hominis* und var. *bovis*.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Veterinär - Medizinischen Fakultät

der Justus Liebig - Hochschule zu Gießen

vorgelegt von

Wolfgang Schneider

Tierarzt aus Janowitz O. S.

GIESSEN 1955

Mit Genehmigung der Veterinär - Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig - Hochschule zu Gießen

Dekan: Professor Dr. Hugo Keller

Berichterstatter: Professor Dr. Hugo Keller

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 1955

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Schrifttum — Die Differenzierung des Mycobacterium tuberculosis var. hominis und var. bovis.	2
I. Mikroskopische Differenzierung	2
II. Differenzierung durch den Tierversuch	2
III. Kulturelle Differenzierung	4
C. Untersuchungsauftrag	9
D. Eigene Untersuchungen	10
I. Zielsetzung	10
II. Verwendete Nährlösung	10
III. Verwendeter Indikator	11
IV. Vorversuche	11
V. Hauptversuche	13
a. Herkunft und Verarbeitung der für die Versuche benutzten Tuberkelbakterienstämme	13
b. Methodik der Messung des pH-Wertes	15
c. Besprechung der Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen	16
1. Versuchsreihe:	
Bovine Erstkulturen, die frisch aus tuberkulös veränderten Lymphknoten von Schlachtrindern gezüchtet wurden. Tab. II.	17
2. Versuchsreihe:	
Humane Erstkulturen, die frisch aus tuberkulösen Sputen von Menschen gezüchtet wurden. Tab. III.	19
3. Versuchsreihe:	
Bovine Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen. Tab. IV.	20
4. Versuchsreihe:	
Humane Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen. Tab. V.	21
d. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	22
E. Schlußsätze	25
F. Literaturverzeichnis	27
G. Lebenslauf	31

A. Einleitung.

Die Tuberkuloseforschung hat in den letzten Jahrzehnten, namentlich seit Anfang des 20. Jahrhunderts einen gewaltigen Aufschwung genommen und grundlegende neue Erkenntnisse geseitigt. Nach dem Bekanntwerden der wechselseitigen Übertragbarkeit des Erregers der Rindertuberkulose auf den Menschen gewann auch die Typendifferenzierung immer mehr an Bedeutung. Der Wert der Typendifferenzierung liegt nicht zuletzt darin, daß sie uns Anhaltspunkte über die Ansteckungsquellen der Tuberkulose geben kann, woraus wiederum die richtigen Vorbeugungs- und Bekämpfungsmaßnahmen eingeleitet werden können.

Die Grundlagen zur Differenzierung der beiden Säugetiertypen des Tuberkelbakteriums schufen in Deutschland die Arbeiten von KOSSEL, WEBER und HEUSS, in England die von GRIFFITH und seinen Mitarbeitern, sowie in den USA die von Th. SMITH, von PARK und KRUMWIEDE. Als Unterscheidungsmerkmal beider Typen wird die Kaninchen-Pathogenität herangezogen, die nur dem Typus bovinus eigen ist. Diese Methode ist heute ausgearbeitet. Sie nimmt aber viel Zeit in Anspruch und ist relativ kostspielig. - Neben dem Tierversuch sind schon frühzeitig Kulturverfahren zur Typenbestimmung der Tuberkelbakterien herangezogen worden. Diese traten jedoch in ihrer Bedeutung zurück, solange die Kultur des Tuberkelbakteriums selbst Schwierigkeiten bereitete. Nach Überwindung dieser Schwierigkeiten kann man sagen, daß die kulturelle Typendifferenzierung immer mehr an Bedeutung gewinnt und den teuren Tierversuch doch stark zurückgedrängt hat. Bei der kulturellen Typendifferenzierung hat man bislang in der Hauptsache die morphologischen Unterschiede der einzelnen Kulturen zur Diagnose der verschiedenen Tuberkelbakterien-Typen herangezogen. Erst in neuerer Zeit wird auch das biologische Verhalten der einzelnen Typen zu diagnostischen Zwecken mit verwertet.

B. Schrifttum.

Die Differenzierung des Mycobacterium tuberculosis var. hominis u. var. bovis.

I. Mikroskopische Differenzierung.

Die Angaben der einzelnen Autoren über die morphologischen Unterschiede der Tuberkelbakterien-Typen im mikroskopischen Bilde sind nicht einheitlich. Es erscheint daher nicht angebracht, allein auf Grund dieser eine Typendiagnose zu stellen.

Kossel, Weber u. Heuß (16) beschreiben in Ausstrichpräparaten aus Bouillonkulturen die menschlichen Tuberkelbakterien als dünne, gleichmäßig gestaltete und gefärbte Stäbchen, die Perlsuchtbazillen dagegen als dickere, plumpe, unregelmäßig gestaltete Stäbchen, die den Farbstoff nur ungleichmäßig aufnehmen. Diese Unterschiede lassen sich nur deutlich an frisch gezüchteten Kulturen nachweisen.

Nach Kolle-Hetsch (15) u. Müller (25) zeigen die Bakterien des humanen Typs schlanke, zum Teil leicht gekrümmte Formen von annähernd gleicher Länge, die sich im ZIEHL-Präparat gleichmäßig färben. Dagegen überwiegen beim bovinen Typ plumpere, kürzere Formen, zum Teil fast punktförmige Gebilde. Auch haben diese Stäbchen sehr ungleiche Länge und nehmen den Farbstoff ungleichmäßig auf, so daß sie vielfach nur schattenhaft gefärbt sind.

Bozkurt (1) stellte bei verschiedenen vorgenommenen Messungen an humanen und bovinen Tuberkelbakterien-Stämmen für erstere Stäbchen von einer Länge von stets $1,5 - 3 \mu$ und einer Breite von etwa $0,1 \mu$ fest. Die Länge der bovinen Stäbchen beträgt durchschnittlich $2,5 - 3 \mu$ und die Breite $0,2 - 0,3 \mu$. Auch auf Grund dieser Untersuchungen ergibt sich, daß die bovinen Tuberkelbakterien etwas plumper als die humanen sind.

II. Differenzierung durch den Tierversuch.

Es ist nicht verwunderlich, daß die Angaben über die Ergebnisse künstlicher Ansteckungsversuche voneinander abweichen, wenn man berücksichtigt, daß nicht nur die Tuberkelbakterienstämme in ihrer Virulenz

schwanken können, sondern auch die Versuchstiere in ihrer natürlichen Resistenz und Empfänglichkeit große individuelle Unterschiede aufweisen.

Bei Rindern zeigen bovine Tuberkelbazillen eine sehr große Pathogenität. Die Verimpfung von 0,05g Kultur unter die Haut, ins Blut oder in die Bauchhöhle bewirkt gewöhnlich eine fortschreitende schwere Tuberkulose. Jungtiere können auch auf alimentärem Wege infiziert werden. Hingegen erzeugt die Impfung mit humanen Bazillen entweder überhaupt keine Erkrankung oder es entsteht nur ein örtlicher Prozess an der Impfstelle.

Das Kaninchen zeigt in der Regel eine große Empfänglichkeit für die bovinen und eine ausgesprochene Resistenz gegenüber den humanen Tuberkelbakterien. Reinkulturen des Typus bovinus unter die Haut oder in die Blutbahn eingespritzt, töten die Tiere innerhalb 3 - 10 Wochen an generalisierter Tuberkulose, während Kulturen des Typus humanus zunächst nur eine örtliche Entzündung oder überhaupt keine Erkrankung hervorrufen. Mitunter tritt der Tod nach Monaten infolge chronischer Tuberkulose der Gelenke, der Nieren und der Lunge ein.

M i t s c h e r l i c h (23) spricht dann von einer bovinen Infektion, wenn tuberkulöse Herde in der Milz, Leber und Niere auftreten, von einer humanen Infektion beim Fehlen der tuberkulösen Herde in diesen Organen. In der Lunge hat er tuberkulöse Veränderungen nicht nur bei bovinen, sondern auch bei humanen Infektionen gesehen. S c h i e c k (27) verimpfte zur Differenzierung verdünnte Emulsionen von Tuberkelbakterien-Reinkulturen in die vordere Augenkammer des Kaninchens:

" Bei Bazillen des humanen Typus entstand dann eine abgeschwächte, entweder garnicht progrediente oder ausheilende Tuberkulose der Iris und evtl. auch der Cornea, während bei einer Infektion mit bovinen Bazillen das Auge an unaufhaltsam fortschreitender und rasch zur Verkäsung führender Tuberkulose zugrundegeht. "

Meerschweinchen sind sehr empfänglich für die Ansteckung sowohl mit humanen als auch und dies noch mehr mit bovinen Tuberkelbakterien. Nach subkutaner Infektion entsteht nach 6 - 10 Tagen eine Anschwellung der regionären Lymphknoten und nach 8 - 12 Wochen gehen die Tiere an generalisierter Tuberkulose zugrunde. Der Tod soll bei einer bovinen

Infektion im allgemeinen früher eintreten.

Goldhamster lassen sich nach Kunze (17) ebenfalls mit Tuberkelbakterien infizieren; auch durch den Typus bovinus leichter als durch den Typus humanus. Eine Typendifferenzierung verspricht aber nach seinen Untersuchungen wegen der Ähnlichkeit der pathologisch-anatomischen und histologischen Befunde bei den verschiedenen Typen, lediglich gestützt auf den unterschiedlichen Bakteriengehalt in Ausstrichpräparaten von Lymphknoten, keinen Erfolg.

III. Kulturelle Differenzierung.

Villemin stellte bei seinen Übertragungsversuchen als erster Unterschiede bezüglich des Tuberkelbakterien-Wachstums aus menschlichem und tierischen Material fest.

Th. Smith (30) hat bereits 1898 darauf hingewiesen, daß die aus menschlichem Sputum und aus Perlsuchtmaterial reingezüchteten Stämme sich in der Kultur sowie bei der Verimpfung auf Kaninchen, Meerschweinchen und Rinder verschieden verhalten. Des weiteren benutzte Smith (30) zur Typendifferenzierung die Tatsache, daß in saurer Glycerinbouillon der Typus humanus und auch bovinus erst Alkali bilden und damit auch die Nährbodenreaktion alkalisch wird. Nach 2-wöchiger Bebrütung nimmt dann aber die Acidität der mit dem Typus humanus beimpften Kulturen rasch zu und hat nach etwa 4 Wochen den ursprünglichen Säuregrad erreicht. Beim Typus bovinus bleibt die Nährbodenreaktion dagegen mehrere Wochen alkalisch. Weber, der im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von KOLLE, KRAUS und UHLENHUTH über die SMITH'schen Befunde referiert, empfiehlt nur möglichst frisch gezüchtete Tuberkelbakterien-Stämme untereinander zu vergleichen. Werauf diese p_H -Verschiebung beruht, haben in neuerer Zeit Henley u. Le Duc (13) in umfangreichen Versuchen festgestellt. Danach entsteht bei der Oxydation des Glycerins eine Säure. Gleichzeitig wird durch die Spaltung von Stickstoffverbindungen Ammoniak frei. Das entstehende Ammoniak neutralisiert zunächst die frei werdende Säure, so daß eine Änderung der Nährbodenreaktion nicht eintreten kann. Sind die Stickstoff-Verbindungen erschöpft, bevor das

Glycerin verbraucht ist, so hört die Vermehrung der Tuberkelbakterien zwar auf, deren Atmung geht jedoch weiter. Dadurch wird das Glycerin weiter gespalten und somit Säure gebildet. Da kein Ammoniak mehr entstehen kann, tritt eine Säuerung der Kulturen ein, bis das Glycerin verbraucht ist.

K o s s e l, W e b e r u. H e u B (16) weisen schon 1904 auf Unterschiede im Wachstum auf Glycerinbouillon hin. Die menschlichen Tuberkelbakterien sind viel leichter zu üppigen Wachstum zu bringen. Zuweilen zeigt sich dies schon im Wachstum auf Serum. Die mit menschlichen Tuberkelbakterien beimpften Kulturröhrchen sind bereits nach 10 - 20 Tagen mit Kolonien dicht besät. Auf den mit Perlsuchtmaterial beimpften Röhrchen ist das Wachstum im allgemeinen ein langsames. Einen noch deutlicheren Unterschied sahen sie auf Glycerinbouillon. (humanus: gleichmäßig dicke, faltige Haut, an der Kölbchenwand empor-kriechend; bovinus: feines, netzartiges Häutchen, mit zuweilen warzen-artigen Verdickungen.) Die Kulturmerkmale der Säugetier-Tuberkel-bakterien wurden also von diesen Autoren bereits so klar und zutref-fend beschrieben, daß sie mit Erfolg zur Differenzierung verwendet wer-den konnten.

A. S. G r i f f i t h (11) unterscheidet unter Zugrundelegung des Wachstums und der Wuchsformen zwischen "eugonischen" und "dysgoni-schen" Stämmen. Als "eugonisch" bezeichnet er Stämme, die auf glycerin-haltigen Substraten schnell und kräftig wachsen. Als "dysgonisch" be-zeichnet er dagegen Stämme, die langsam und schlecht auf glycerinhalti-gen und meist besser auf glycerinfreien Substraten wachsen. Alle "eugonisch" wachsenden Stämme, die außerdem Pigment bilden, gehören nach G r i f f i t h zum humanen Typ. Diejenigen, die "dysgonisch" wachsen und kein Pigment aufweisen, gehören zum bovinen Typ. Auch G r i f f i t h hat mit Nachdruck betont, dass eine sichere Typen-diagnose nur an frisch isolierten Kulturen gestellt werden kann. Die von ihm angegebenen Richtlinien zur Typendifferenzierung haben sich auch bei der Verwendung der Nährböden von LÖWENSTEIN, ROHN und von PETRAGNANI sehr gut bewährt.

K u r z w e i l (18) prüfte den Wert des PETRAGNANI-Nährbodens und dessen Modifikation nach WITTE für die Typendifferenzierung. Bei länger fortgezüchteten Kulturen ist nach seinen Angaben die Differenzierung der Stämme nicht immer mit Sicherheit durchzuführen und in diesen Fällen der Tierversuch mit heranzuziehen. Im allgemeinen sei jedoch der Wert des Nährbodens für die Tuberkelbakterien-Differenzierung nicht zu bezweifeln.

G o t t s a c k e r (6) erhält neuerdings eine Differenzierungsmöglichkeit auf dem SAUTON-Agar. Bei hinreichender Einsaat bildet hierauf der humane Typ eindrucksvolle Riesenkolonien, während sich der bovine Typ nur spärlich entwickelt. Ebenfalls hält er die SAUTON-Lösung für geeignet. Noch bessere Ergebnisse lassen sich durch Zusatz von Ei und Eidotter zu SAUTON-Agar erreichen. Ein Zusatz von 10% Gesamtei zum SAUTON-Agar für die Züchtung des Typus humanus und 5% für die Züchtung des Typus bovinus verbessern das Wachstum. Noch günstiger, speziell für den bovinen Typ, sind die Ergebnisse mit Eigelb. Dieses steigert die Wachstumsintensität kontinuierlich. In einer weiteren Mitteilung empfiehlt G o t t s a c k e r (9) einen Nährboden aus einem gleichteiligen Gemisch von Eigelb einerseits und SAUTONlösung mit wässrigen Hirn- oder Fischauszug andererseits, der über SAUTONagar zum Erstarren gebracht wird. Darauf unterscheiden sich die Typen nicht nur in der Form, sondern auch in der Farbe der Kolonien: Typus humanus bildet relativ große, gelbbraune, warzen- und nabelförmige Kolonien. Typus bovinus bildet relativ kleine, bleiche, manchmal segmentierte oder rosettenförmige Kolonien.

S t r e h l (31) konnte nachweisen, daß durch Zusatz von Malachitgrün bzw. Gentiana-Violett zu synthetischen Nährböden (Sy-Ser) das Wachstum des Typus humanus nur gehemmt, das des Typus bovinus jedoch vollständig unterdrückt wird, so daß es möglich ist, durch Zusatz dieser Farbstoffe zu synthetischen Nährböden die Typen mit Sicherheit zu unterscheiden.

W a g e n e r u. M i t s c h e r l i c h (32) erreichten auf dem von ihnen entwickelten Bromkresolpurpurnährboden eine bessere Differenzierungsmöglichkeit des Typus humanus und Typus bovinus. Diese er-

gibt sich aus der Säuerung des Nährbodens durch den Typus humanus. Dabei schlägt die ursprünglich stahlblaue Farbe des Nährbodens in gelb mit leicht grünlichen Einschlag um. Zur sicheren Diagnose ist dabei einmal ein üppiges Wachstum der Kulturen erforderlich, zum anderen sind nur relativ frisch isolierte Stämme zu verwenden. Bei länger fortgezüchteten Stämmen gleichen sich die kulturellen Merkmale des Typus bovinus denen des Typus humanus an. W a g e n e r u. M i t s c h e r - L i c h betonen aber, daß diese Angleichung nicht nur in der Kultur, sondern auch im Kaninchenversuch eintritt.

G r a c k (10) untersuchte u.a. die Brauchbarkeit des Bromkres-violett-Nährbodens zur Differenzierung der Säugetiertypen und findet ihn dafür geeignet. Bei ca. 66% der von ihm untersuchten Stämme des *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* beobachtete er nach 33,6 Tagen einen Farbumschlag eines oder mehrerer der beimpften Nährböden. Es sind nach seiner Ansicht aber nur die durch einen Farbumschlag als Typus humanus gekennzeichneten Stämme als ziemlich sicher differenziert anzusehen, da sich unter den Stämmen, die keinen Umschlag des Nährbodens hervorrufen, noch solche des Typus humanus befinden können.

M e y n (21) gibt speziell für den PETRAGNANI-Nährboden folgende Kulturmerkmale zur Typendifferenzierung an:

Typus humanus: Üppiges, trocken-krümeliges, gelbliches Wachstum, später Pigmentbildung. Erste Kolonie nach 2 - 3 Wochen sichtbar. Die Stämme wachsen auf glycerinhaltigen Nährböden wesentlich besser als auf glycerinfreien.

Typus bovinus: Zartes, feucht-glänzendes, hellgelbes Wachstum, keine Pigmentbildung. Erste Kolonien nach 4 - 8 Wochen sichtbar. Die große Mehrzahl der Stämme wächst in der Erstkultur auf glycerinhaltigen Nährböden schlechter als auf glycerinfreien. In einer neueren Arbeit berichtet M e y n (22) von einem festen Nährboden der CASELLA-Farwerke (Mainkur), der sich zur Differenzierung der Typen eignet. Nach seinen Angaben kommen in den CASELLA-Kulturen die Typenunterschiede besser zur Entwicklung als in den PETRAGNANI-Kulturen.

Neuhäuser (26) hat in einer umfangreichen Arbeit die neueren Spezialnährböden miteinander verglichen, indem er auf ihnen 100 typenunbekannte Tuberkelbakterienstämme züchtete. Als bisher sicherste kulturelle Differenzierungsmethode erkannte er die gleichzeitige Beimpfung des Eigelb-Nährbodens nach GOTTSACKER und des Breakresolpurpur-Nährbodens nach WAGENER und MITSCHERLICH.

H. Meyer (19) züchtete Tuberkelbakterien vom Typus humanus und Typus bovinus auf dem von Witte modifizierten PETRAGNANI-Nährboden. Den Nährböden waren in Vorversuchen verschiedene Indikatoren zugesetzt, mit deren Hilfe eine Änderung der Acidität der Nährböden angezeigt werden sollte. In diesen Vorversuchen erwies sich das Nitrazingelb in einer Konzentration von 0,01% am geeignetsten und wurde in den Hauptversuchen ausschließlich verwendet. Bei der Beimpfung fanden sowohl ältere Laboratoriumsstämme des Typus humanus und Typus bovinus, als auch frisch aus menschlichem Lungenauswurf isolierte Stämme Verwendung. Desgleichen wurden Stämme von an generalisierter Tuberkulose erkrankten Schlachtrindern isoliert. Bei den Hauptversuchen zeigte sich, daß nach etwa 3 - 4-wöchiger Bebrütung alle bovinen Kulturen in Abhängigkeit zu ihrem Wachstum eine nachweisbare Vermehrung der Acidität des Nährbodens herbeiführten. Die Farbe der Nährbodenoberfläche schlug von Blaugrau nach Gelb um. Diese Säuerung zeigten die bovinen Stämme besonders bei Glycerinzusatz; aber auch auf glycerinfreien Nährböden. Eine Anpassung älterer, länger fortgezüchteter Stämme des bovinen Typs an den humanen, wie sie von WAGENER und MITSCHERLICH (32) beschrieben wird, konnte Meyer nicht feststellen.

C. Untersuchungsauftrag.

Herr Professor Keller gab mir die Aufgabe, in Verfolg der Ergebnisse der Arbeit von H. Meyer (19), humane und bovine Tuberkelbakterien in der LOCKEMANNlösung zu züchten und zu prüfen, ob sich auf Grund einer etwaigen Aciditätsänderung der Nährlösung durch den einen oder anderen der Typen eine Differenzierung ermöglichen läßt. Die Änderung des p_H -Wertes sollte mit dem Indikator Nitrazingelb ermittelt werden.

D. Eigene Untersuchungen.

I. Zielsetzung.

Da sich die kulturellen Typenmerkmale humaner und boviner Tuberkelbakterienstämme beim Fortzüchten durch mehrere Kulturpassagen angleichen können, kam es mir darauf an, möglichst frisch gezüchtete Stämme für die Versuche zu verwenden und deren biologisches Verhalten in der LOCKEMANNLösung zu untersuchen. Eine geeignete Methode zur Messung des p_H -Wertes der Nährlösung sollte gefunden werden.

II. Verwendete Nährlösung.

Die bei den Versuchen verwendete LOCKEMANNLösung wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

- | | |
|--|----------|
| 1. Asparagin | 0,7 g |
| 2. Dinatriumphosphat
(0,46 g in 20 ccm Aq.dest. lösen
u. 4 ccm der Lösung nehmen) | 0,092 g |
| 3. Monokaliumphosphat
(0,6 g in 20 ccm Aq.dest. lösen
u. 4 ccm der Lösung nehmen) | 0,12 g |
| 4. Magnesiumsulfat | 0,4 g |
| 5. Natriumzitrat | 0,9 g |
| 6. Ferriammonsulfat
(0,25 g in 5 ccm Aq.dest. lösen, 1 ccm hiervon mit 9 ccm Aq.dest. verdünnen und von dieser Verdünnung 0,3 ccm nehmen) | 0,0015 g |
| 7. Glycerin | 20,0 g |
| 8. Aqua dest. (heiß) | 200,0 g |

Nach vollständiger Lösung wird die Gesamtmenge in 2 gleiche Teile geteilt. Einem Teil wird noch 1,0 g Arabinose hinzugefügt. Beide Lösungen werden auf pH 6,7 eingestellt, ein Wert, der sowohl für das Wachstum humaner als auch boviner Tuberkelbakterienstämme geeignet ist. Danach wird 30 Min. bei $100^{\circ} C$. sterilisiert. Die Lösung wird zu je 5 ccm in Reagenzgläser abgefüllt und nochmals sterilisiert.

III. Verwendeter Indikator.

Zur Feststellung des pH-Wertes der Nährlösung wurde als Indikator das Nitrazingelb der chemischen Fabrik E.MERCK, Darmstadt, verwendet. Dieses hat sich in der Lebensmittelüberwachung als Indikator gut bewährt und wird von B u B u. S c h m i t t (4) auch für die Säure-Lauge-Titration empfohlen. Das Nitrazingelb wird in der Verdünnung 1 : 10 000 verwendet. Der pH-Bereich liegt zwischen 6 und 7. Der Farbumschlag erfolgt sehr genau und scharf. Die Nitrazingelblösung färbt sich bei pH 6,0 gelb, bei pH 6,2 gelbbraunlich, bei 6,3 gelbbraun, bei 6,4 gelbbraun mit olivgrünem Schimmer, bei 6,5 olivgrün, bei 6,6 bis 6,7 grünviolett, bei 6,8 und darüber tiefblauviolett.

IV. Vorversuche.

Der Zweck der Vorversuche war einmal der, festzustellen, ob eine Reaktionsänderung der Nährlösung nach der Beimpfung bei einsetzendem Wachstum der Tuberkelbakterien eintritt, und zum anderen, eine Methode zu finden, dieselbe zu messen. Es erschien am einfachsten, den Indikator der Nährlösung zuzusetzen und so direkt deren pH-Änderung durch Farbumschlag festzustellen. Der Zusatz geschah in der Weise, daß die Lösung den Indikator in der Konzentration von 1 : 10 000 enthielt. Die Farbe der Lösung war rotviolett. -

Je 3 humane und bovine Tuberkelbakterienstämme wurden in den beiden Nährbodenvariationen (L und LA) verimpft. Die Stämme waren schon in mehreren Passagen auf PETRAGNANI-WITTE-Nährböden fortgezüchtet worden. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle I zu ersehen.

Tabelle I.

		LOCKEMANNLösung + Glycerin + Indikator (L)							LOCKEMANNLösung + Glycerin + Arabinose + Indikator (LA)						
Stamm- bezeich- nung		1. Wachs- tum	2. Wo.	3. Wo.	4. Wo.	5. Wo.	6. Wo.	7. Wo.	1. Wachs- tum	2. Wo.	3. Wo.	4. Wo.	5. Wo.	6. Wo.	7. Wo.
Bov.	Vallée	10.Tg.	+	+	++	++	++	++	10.Tg.	+	++	++	++	++	++
	H 30/53	11.Tg.	+	+	+	+	+	+	11.Tg.	+	+	+	++	++	++
	776/53	10.Tg.	+	+	+	+	+	+	9.Tg.	+	+	+	+	+	+
Hum.	PN	10.Tg.	+	+	+	+	+	+	11.Tg.	+	+	+	+	+	+
	1 hum.	11.Tg.	+	+	+	+	+	+	12.Tg.	+	+	+	+	+	+
	DT	9.Tg.	+	+	++	++	++	++	9.Tg.	+	+	++	++	++	++

Zeichenerklärung: L = LOCKEMANNLösung + Glycerin

LA = LOCKEMANNLösung + Glycerin + Arabinose

+ = schwache Säuerung (p_H 6,6 - 6,5).

++ = stärkere Säuerung (p_H 6,4).

Das Ergebnis des Versuches war wie folgt:

Das erste deutlich sichtbare Wachstum, sowohl der humanen als auch der bovinen Stämme war nach durchschnittlich 10 Tagen zu erkennen. Mit 1 - 2 Tagen Unterschied zeigte sich bei sämtlichen Kulturen am Ende der 2. Woche eine leichte Aufhellung des Nährsubstrates und eine Änderung des Farbtones nach Rot (+ = p_H 6,6 - 6,5). Ein Unterschied zwischen humanen und bovinen Stämmen war nicht zu erkennen. Grünlich (++ = p_H 6,4) wurde die Farbe der Kultur des humanen Stammes DT bei L und LA in der 4. Woche. Den gleichen Farbton zeigte auch der bovine Stamm Vallée ab der 3. Woche bei LA und ab der 4. Woche bei L, sowie der bovine Stamm H 30/53 ab der 5. Woche bei LA. Bei den übrigen Kulturen konnte keine Änderung des in der 2. Woche eingetretenen rötlichen Farbtones mehr beobachtet werden. Vielmehr zeigte sich bei diesen ab der 3. Woche ein Sistieren des Wachstums der Kulturen. Es ist anzunehmen, daß diese Hemmung auf den Zusatz des Indikators zurückzuführen ist.

Der Versuch ergab, daß sowohl ein humaner und ein boviner Stamm in L und LA, sowie ein boviner Stamm in LA eine stärkere Säuerung (++) der Nährlösung bewirkt hatten. Ein Unterschied zwischen humanen und bovinen Stämmen, die im Wachstum nicht beeinträchtigt waren, konnte nicht festgestellt werden. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß es sich um Stämme handelte, die schon länger unter gleichen Bedingungen fortgezüchtet waren. Jedenfalls konnte bei ungehemmtem Wachstum der Kulturen eine Aciditätszunahme bei den humanen und bei den bovinen Stämmen festgestellt werden. Die Messung des p_H -Wertes durch Zusatz des Indikators zur Nährlösung hat sich als nicht günstig erwiesen, da eine Wachstumshemmung einzelner Stämme eintrat.

V. Hauptversuche.

a) Herkunft und Verarbeitung der für die Versuche benutzten Tuberkelbakterienstämme.

Die Tuberkelbakterienkulturen des Hauptversuches wurden einmal aus tuberkulös veränderten Lymphknoten und Sputen, zum anderen durch Überimpfung von Reinkulturen in 4 Versuchsreihen angelegt. In jeder Versuchsreihe wurde jeweils mit dem gleichen Sediment bzw. der gleichen Reinkultur ein Nährboden, bestehend aus LOCKEMANNlösung + Glycerin (Bezeichnung = L) und ein Nährboden der Zusammensetzung LOCKEMANNlösung + Glycerin + Arabinose (Bezeichnung = LA) beimpft.

Die einzelnen Versuchsreihen setzten sich aus folgenden Kulturen zusammen:

1. Versuchsreihe:

Bovine Erstkulturen, die frisch aus tuberkulös veränderten Lymphknoten von Schlachtrindern gezüchtet wurden.

2. Versuchsreihe:

Humane Erstkulturen, die frisch aus tuberkulösen Sputen von Menschen gezüchtet wurden.

3. Versuchsreihe:

Bovine Subkulturen, angelegt von PETRAGNANI-Erstkulturen.

4. Versuchsreihe:

Humane Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen.

Die Vorbehandlung des Materials geschah bei den einzelnen Versuchsreihen folgendermaßen:

1. Versuchsreihe:

Zunächst wurde bei der Entnahme der Lymphknoten darauf Wert gelegt, daß diese möglichst nicht oder nur wenig verkalkt waren, da die Züchtung von Tuberkelbakterien aus verkalktem Material nur schwer oder gar nicht gelingt. Von den Lymphknoten wurde ein etwa haselnußgroßes Stück möglichst aus den Randzonen des veränderten Gewebes entnommen, mit steriler Schere und Pinzette im sterilen Mörser zerkleinert und unter Zugabe von steriler physiologischer Kochsalzlösung mit dem Pistill fein verrieben. Diese Aufschwemmung wurde durch sterile Gaze in ein steriles Zentrifugenröhrchen filtriert und 30 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert. Darauf wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen. Aus dem Sediment wurde zunächst ein Objektträgerausstrich angefertigt und nach B u B (3) gefärbt. Nun wurde das Sediment mit 5 ccm einer 10%-igen Schwefelsäure-Lösung überschichtet, darin verrührt und 10 Min. stehen gelassen; anschließend nochmals 10 Min. zentrifugiert. Um bei der Verimpfung des Sediments den eingestellten pH-Wert 6,7 der Nährlösung nicht zu verändern, wurde der Inhalt der Zentrifugenröhrchen zunächst mit 1,7 ccm einer 32%igen Natronlauge neutralisiert. Der Bodensatz konnte nunmehr nach Abgießen der Flüssigkeit in die Nährlösung verimpft werden, ohne daß eine pH-Änderung derselben eintrat, was durch sofortige Messung nach der Beimpfung festgestellt wurde. Verimpft wurden nur solche Sedimente, in deren Objektträger-Ausstrich Tuberkelbakterien nachgewiesen wurden.

2. Versuchsreihe:

Die Sputen stammen von an offener Lungentuberkulose erkrankten Menschen und wurden mir von einer Heilstätte im Gießen zur Verfügung gestellt. Von sämtlichen Sputen waren Ausstrich-Präparate angefertigt und mikroskopisch Tuberkelbakterien nachgewiesen worden. Die Verarbeitung von Sputen erfolgte deshalb, weil es sich bei offener Lungentuberkulose des Menschen in den meisten Fällen um eine Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis var. hominis* handelt. Die Vorbehandlung der Sputen zur Verimpfung geschah nach der von Buchert (2)

beschriebenen Methode wie folgt:

Etwa 2 ccm Sputum wurde in dickwandigen, sterilen Schüttelröhrchen mit 7 ccm einer 8,8%igen Trinatriumphosphatlösung versetzt, mit Gummistopfen verschlossen und bis zur Homogenisierung mit der Hand kräftig geschüttelt. Die Röhrchen wurden sodann 24 Std. bei 37°C. gehalten, anschließend der Inhalt in Zentrifugenröhrchen umgegossen und 25 Min. bei 4000 U/min. zentrifugiert. Nach Abgießen der Flüssigkeit wurde das Sediment mit De Haën'scher Pufferlösung (p_H 7,0) gewaschen, erneut zentrifugiert und in die Nährböden verimpft. Vorgenommene Messungen zeigten keine Änderung des Nährboden- p_H nach der Verimpfung.

3. Versuchsreihe:

Die zur Anlegung dieser Versuchsreihe verwendeten Reinkulturen wurden ohne Vorbehandlung in die LOCKEMANNLösung verimpft. Die Kulturen waren von mir aus tuberkulösen Lymphknoten von Rindern auf PETRAGNANI-WITTE-Nährböden gezüchtet worden. Überimpft wurden nur solche Stämme, die in der Erstkultur auf PETRAGNANI ohne Glycerin besser gewachsen waren und bei deren Parallelkulturen auf PETRAGNANI mit Glycerin sich dysgonisches Wachstum zeigte. Gleichzeitig mit der Anlegung der LOCKEMANN-Kulturen wurden Agarnährböden beimpft. Trat auf Agar Wachstum ein, wurden die entsprechenden LOCKEMANN-Kulturen aus der Versuchsreihe entfernt.

4. Versuchsreihe:

Die humanen Reinkulturen wurden mir vom Human-Hygienischen Institut, Gießen zur Verfügung gestellt. Es handelte sich ebenfalls um Erstkulturen auf PETRAGNANI-Nährböden. Eine Vorbehandlung der Stämme zur Verimpfung erfolgte nicht.

Die Bebrütung der Röhrchen erfolgte bei einer Brutschranktemperatur von 37 - 38°C.

b) Methodik der Messung des p_H -Wertes.

Der p_H -Wert der LOCKEMANNlösungen wurde jeweils am 9., 16., 30., 44. u. 60. Tage gemessen. Da, wie der Vorversuch ergab, die Messung durch Zusatz des Indikators zur Nährlösung nicht angebracht erschien, wurde sie nach folgender Methode vorgenommen:

Auf eine mit Aq.dest. gewaschene trockene Tüpfelschale wurden mit einer Pipette 2 Tropfen Nitrazingelb-Lösung (1; 10000) und direkt daneben 4-5 Ösen (Durchmesser der Öse 4 mm) der Kulturflüssigkeit verbracht. Durch Überführen mit der Öse wurden die beiden Flüssigkeiten miteinander in Berührung gebracht. Die dann fächerartig in die Nitrazingelblösung hineinfließende Kulturflüssigkeit bewirkte sofort einen streifenförmigen Farbumschlag des Indikators, so daß der p_H -Wert sofort abgelesen werden konnte. Dieser Farbumschlag dehnte sich nach kurzer Zeit auf die gesamte Indikatorlösung aus. - Bemerkt sei noch, daß die Öse vor jedem Gebrauch ausgeglüht wurde. Nach der Probenentnahme wurden die Kulturröhrchen wieder mit verflüssigtem Hartparaffin verschlossen.

c) Besprechung der Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen.

Vorbemerkung: Bei der Besprechung der Ergebnisse bezeichne ich die beiden Nährboden-Variationen der einzelnen Versuchsreihen jeweils als Unterreihe L = LOCKEMANNLösung + Glycerin und als Unterreihe LA = LOCKEMANNLösung + Glycerin + Arabinose. Die Zahlen bzw. Zeichen in den Tabellen bedeuten:

Zahlen unter l.W.T. geben den Tag des ersten sichtbaren Wachstums in der LOCKEMANNLösung an. Zahlen unter PETRAGNANI m.Glyc. und o.Glyc. geben den Tag des ersten sichtbaren Wachstums der PETRAGNANI-Kulturen an (zum Vergleich).

Zeichenerklärung zu Tabelle II-V.

-	"	keine Säuerung des Nährbodens	(p_H 6,7)
+	"	schwache " " "	(p_H 6,6 - 6,5)
++	"	stärkere " " "	(p_H 6,4)
+++	"	starke " " "	(p_H 6,3 u. darunter)

Bovine Erstkulturen, frisch aus tuberkulösen Rinderlymphknoten in

Stamm Nr.	LOCKEMANNLösung + Glycerin (L)						LOCKEMANNLösung		
	1.W.T.	9.Tag	16.Tag	30.Tag	44.Tag	60.Tag	1.W.T.	9.Tag	16.
1	8.	-	-	-	++	+++	7.	-	
2	7.	+	+++	+++	+++	+++	7.	++	+
3	7.	-	-	-	++	++	7.	++	++
4	7.	+	+++	+++	+++	+++	7.	++	++
5	7.	+	+++	+++	+++	+++	6.	++	++
6	7.	++	+++	+++	+++	+++	6.	+	+
7	8.	+	+	++	++	+++	8.	+	+
8	12.	-	+	++	++	+++	7.	+	
9	9.	-	+	++	++	++	8.	+	
10	8.	+	++	++	++	++	8.	+	++
11	8.	+	++	++	++	+++	7.	+++	++
12	8.	+	++	+++	+++	+++	8.	+	++
13	7.	-	+	++	++	++	7.	-	
14	7.	-	+	-	-	-	9.	+	+
15	9.	-	+	+	+	+	8.	+	+
16	8.	-	-	-	-	-	8.	-	+
17	7.	-	+	+	++	++	7.	-	++
18	9.	-	+	+	+	+	9.	-	
19	7.	-	+	+	++	++	6.	-	
20	7.	+	+	++	++	++	6.	+	
21	9.	-	-	+	+	+	8.	+	
22	9.	-	-	+	+	+	9.	+	
23	7.	-	-	++	++	++	6.	+	
24	6.	-	+	++	++	++	6.	+	

1. Versuchsreihe:

Bovine Erstkulturen, die frisch aus tuberkulös veränderten Lymphknoten von Schlachtrindern gezüchtet wurden. Tab. II.

Im Verlauf der Untersuchungen fielen die Kulturen von zwei Stämmen aus. Davon eine Kultur wegen Verunreinigung, die andere deswegen, weil bei der mikroskopischen Untersuchung der Kultur keine Tuberkelbakterien nachweisbar waren. Zur Beurteilung kamen die Kulturen von 24 Stämmen. Das erste Wachstum der Kulturen zeigte sich in der Unterreihe L nach durchschnittlich 7,8 Tagen, in der Unterreihe LA nach 7,3 Tagen. Auf PETRAGNANI m.Glyc. nach 33,6 Tagen und auf PETRAGNANI o.Glyc. nach 30,6 Tagen.

Die erste Untersuchung am 9.Tag ergab in der Unterreihe L schwache Säuerung von 8 Kulturen und stärkere Säuerung von einer Kultur. In der Unterreihe LA zeigten bereits 13 Kulturen eine schwache, 4 Kulturen eine stärkere und eine Kultur eine starke Säuerung. Die Untersuchung am 16.Tag ergab unter L schwache Säuerung von 11 Kulturen, stärkere Säuerung von 3 und starke Säuerung von 4 Kulturen; bei LA schwache Säuerung von 11, stärkere Säuerung von 8 und starke Säuerung von 5 Kulturen. Am 30.Tag bei L schwache Säuerung von 6, stärkere Säuerung von 9 und starke Säuerung von 5 Kulturen; dagegen unter LA schwache Säuerung von 4, stärkere Säuerung von 10 und starke Säuerung von 10 Kulturen. Am 40.Tag bei L schwache Säuerung von 4, stärkere Säuerung von 13 und starke Säuerung von 5 Kulturen; unter LA stärkere Säuerung von 11, starke Säuerung von 13 Kulturen. Bei der letzten Untersuchung am 60.Tag zeigten bei L keine Säuerung 2 Kulturen, schwache Säuerung 4, stärkere und starke Säuerung je 9 Kulturen. In der Unterreihe LA hatten dagegen 7 Kulturen stärker und 16 Kulturen stark gesäuert. Eine Kultur war bei der letzten Untersuchung verunreinigt.

Die 1.Versuchsreihe zeigt, daß alle bovinen Stämme der Unterreihe LA spätestens bis zum 16.Tag eine mehr oder weniger starke Zunahme der Acidität des Nährbodens bewirkt hatten. In der Unterreihe L zeigte sich zu diesem Zeitpunkt dagegen erst bei 18 Kulturen eine Aciditätszunahme. Die laufenden Untersuchungen ergaben weiter, daß in der Unterreihe LA die Acidität der Kulturen noch weiter zunahm, so daß am 60.Tag 17 von 24 Kul-

turen stark sauer (+++) reagierten, während bei 7 Kulturen die Acidität etwas geringer war (++) . Bei L dagegen trat bei einer Kultur (Nr.16) bis zum Schluß überhaupt keine Änderung ein, bei einer zweiten (Nr.14) ging die bis zum 16.Tag erreichte schwache Acidität wieder auf den Ausgangswert der Lösung zurück. Von den übrigen Kulturen dieser Unterreihe reagierten am 60.Tag 4 schwach (+), 9 stärker (++) und 9 stark (+++) sauer. Ein Vergleich der beiden Unterreihen zeigt, daß die bovinen Tuberkelbakterienstämme wohl in beiden Nährböden eine Aciditätszunahme hervorgerufen hatten. Diese war jedoch in den Nährböden der Unterreihe LA im allgemeinen früher, spätestens am 16.Tag, und stärker zu erkennen.

Tabelle III.

Humane Erstkulturen, die frisch aus tuberkulösen Sputen von Menschen gezüchtet wurden. Prüfung auf Säuerung der LOCKEMANN-Lösung.

Stamm Nr.	LOCKEMANNLösung + Glycerin (L)						LOCKEMANNLösung. + Glycerin+Arabinose (LA)						PETRAG. Nährb. m. Glycer. o. Glycer.	
	1. W. T.	9. Tag	16. Tag	30. Tag	44. Tag	60. Tag	1. W. T.	9. Tag	16. Tag	30. Tag	44. Tag	60. Tag		
1	2.	-	-	-	-	-	8.	-	-	-	++	++	25.	-
2	12.	-	-	-	-	-	9.	-	-	+	+	++	23.	26.
3	7.	-	-	-	+	+	10.	-	-	+	++	++	21.	21.
4	6.	-	-	-	-	-	8.	-	-	-	+	++	14.	29.
5	7.	-	-	-	-	-	6.	-	-	-	+	++	28.	29.
6	7.	-	-	-	+	+	7.	-	-	-	++	++	15.	30.
7	6.	-	-	-	-	-	6.	-	-	-	++	++	28.	-
8	8.	-	-	-	+	+	8.	-	-	-	++	+++	20.	29.
9	7.	-	-	-	-	-	8.	-	-	+	++	++	11.	18.
10	8.	-	-	-	+	+	8.	-	-	+	++	++	20.	35.
11	8.	-	-	-	-	+	8.	-	-	-	+	+	22.	26.
12	6.	-	-	-	-	+	6.	-	-	-	++	++	-	21.
13	7.	-	-	-	+	+	6.	-	-	-	++	++	22.	34.
14	6.	-	-	-	-	+	6.	-	-	-	+	++	21.	35.
15	6.	-	-	-	-	+	7.	-	-	-	+	+	15.	26.
16	6.	-	-	-	+	+	7.	-	-	-	+	++	15.	30.
17	6.	-	-	-	-	-	6.	-	-	-	+	+	14.	18.

2. Versuchsreihe:

Humane Erstkulturen, die frisch aus tuberkulösen Sputen von Menschen gezüchtet wurden. Tab.III.

In dieser Reihe fiel eine Kultur durch Verunreinigung aus. In den beiden Unterreihen war das erste Wachstum nach durchschnittlich 7,2 Tagen sichtbar. Bei den Parallelkulturen auf PETRAGNANI m.Glyc. nach 19,6 Tagen und auf PETRAGNANI o.Glyc. nach 27,1 Tagen.

Die Kulturen der humanen Stämme beider Unterreihen zeigten bis zum 16. Tage noch keine Zunahme der Acidität. Bei der 3. Untersuchung am 30. Tage zeigte in der Unterreihe L lediglich eine Kultur eine schwache (+) Säuerung. Bei allen Kulturen dieser Unterreihe, bei denen überhaupt eine Aciditätszunahme eintrat, war sie bis zur letzten Untersuchung nur schwach (+). Bei 7 Kulturen war die Reaktion bis zum Schluß unverändert. In der Unterreihe LA hatten am 30. Tag die ersten 5 Kulturen schwach (+) gesäuert. Am 44. Tag hatte die Acidität bei 7 Kulturen schwach (+) und bei 10 Kulturen stärker (++). zugenommen. Den gleichen Befund hatten am 60. Tag 2 (+) und 14 (++) Kulturen. 1 Kultur war stark gesäuert (+++).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von beiden Unterreihen der 2. Versuchsreihe sieht man ebenfalls, daß in dem Nährboden mit Arabinose-Zusatz die Aciditätszunahme allgemein stärker war.

3. Versuchsreihe:

Bovine Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen.

Tab. IV.

In dieser Versuchsreihe sind durch Verunreinigungen keine Kulturen ausgefallen. Eine Kultur mußte entfernt werden, da sich auf dem mit der gleichen Reinkultur beimpften Agarnährboden Wachstum einstellte. Es handelte sich dabei um apathogene Mykobakterien.

Das erste Wachstum zeigten die Stämme der Unterreihe L nach durchschnittlich 9 Tagen, die der Unterreihe LA nach 8,9 Tagen. Auf PETRAGNANI m.Glyc. war das erste Wachstum nach 19,3, auf PETRAGNANI o.Glyc. nach 12,2 Tagen zu erkennen.

In der Unterreihe L hatten von 17 bovinen Stämmen 5 keine Änderung der Nährbodenacidität verursacht. Bei 2 Stämmen (Nr. 2 u.4) war die bis zum 30.Tag erreichte Acidität des Nährbodens wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen. Bei den anderen Kulturen dieser Unterreihe nahm die Acidität auch nur spät und meistens schwach zu, so daß das Ergebnis wenig einheitlich erscheint. Besser und einheitlicher dagegen bei der Unterreihe LA. Hier war am 9.Tag bereits bei 8 Kulturen eine schwache (+) Aciditätszunahme zu verzeichnen, während am 16.Tag bei allen Kulturen der Ausgangs- p_H unterschritten war. Zu letzterem Zeitpunkt waren 8 Kulturen schwach (+) und 9 Kulturen bereits stärker (++) gesäuert. Weiterhin nahm die Acidität bei allen Kulturen kontinuierlich zu und die Untersuchung am 60.Tag ergab in 7 Fällen eine stärkere (++) und in 10 Fällen eine starke (+++) Säuerung der bovinen Kulturen.

Bovine Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI - Erstkulturen
Prüfung auf Säuerung der LOCKEMANNLösung.

Stamm Nr.	LOCKEMANNLösung + Glycerin (L)						LOCKEMANNLösung + Glycerin+arabinose (LA)						PETRAGNANI-Nährb.	
	1.W.Tg.	9.Tg.	16.Tg.	30.Tg.	44.Tg.	60.Tg.	1.W.Tg.	9.Tg.	16.Tg.	30.Tg.	44.Tg.	60.Tg.	m. Glvc.	o. Glvc.
1	10.	-	+	+	+	++	10.	-	+	++	++	+++	24.	11.
2	9.	-	+	+	-	-	9.	-	+	+++	+++	+++	21.	10.
3	9.	+	+	+	+++	+++	10.	-	+	++	++	++	19.	9.
4	9.	-	+	+	-	-	9.	-	+	+++	+++	+++	21.	9.
5	9.	-	-	++	++	+++	9.	+	++	+++	+++	+++	22.	9.
6	9.	-	-	+	++	+	9.	+	++	+++	+++	+++	22.	10.
7	8.	-	-	-	-	-	9.	+	++	+++	+++	+++	15.	9.
8	10.	-	-	+	++	++	9.	-	+	+++	+++	+++	18.	8.
9	9.	-	-	-	-	-	9.	+	++	++	++	++	16.	9.
10	8.	-	+	+	+	++	8.	-	++	++	++	++	-	21.
11	8.	-	-	-	+	+	9.	+	++	++	++	++	18.	18.
12	10.	-	-	-	-	-	9.	+	++	++	++	+++	17.	13.
13	9.	-	+	+	+	+	9.	+	++	++	++	+++	18.	8.
14	8.	-	-	+	+	+	9.	+	+	++	++	++	17.	15.
15	10.	-	+	+	+	+	8.	-	+	++	++	+++	24.	23.
16	9.	-	-	-	-	-	8.	-	+	+	++	++	20.	13.
17	9.	-	-	-	-	-	9.	-	++	++	++	++	18.	14.

Tabelle V.

Humane Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen.
Prüfung auf Säuerung der LOCKEMANN-Lösung.

Stamm Nr.	LOCKEMANN-Lösung + Glycerin (L)						LOCKEMANN-Lösung + Glycerin + Arabinose (LA)						PETRAGNANI-Nährb. m.Glyc. o.Glyc.
	1. Wgt.	9. Tg.	16. Tg.	30. Tg.	44. Tg.	60. Tg.	1. Wgt.	9. Tg.	16. Tg.	30. Tg.	44. Tg.	60. Tg.	
1	15.	-	-	-	-	-	7.	-	-	+	+	+	20.
2	13.	-	-	+	+	++	7.	-	-	+	+	+	7.
3	7.	-	-	-	-	-	7.	-	-	-	+	+	25.
4	12.	-	-	-	+	+	8.	-	-	+	+	+	18.
5	7.	-	-	-	-	-	7.	-	-	-	+	+	7.
6	7.	-	-	-	-	-	8.	-	-	+	+	++	7.
7	9.	-	-	-	+	+	13.	-	-	-	+	+	12.
8	10.	-	-	-	-	-	7.	-	-	-	-	-	5.
9	6.	-	-	+	+	+	6.	-	-	+	+	+	10.
10	7.	-	-	+	+	+	7.	-	-	+	+	+	6.
11	17.	-	-	-	+	+	7.	-	-	+	+	+	7.
12	7.	-	-	-	-	+	6.	-	-	+	+	++	5.
13	10.	-	-	+	+	+	7.	-	-	+	+	+	20.
14	7.	-	-	+	+	+	7.	-	-	+	+	+	-
15	10.	-	-	++	++	+++	10.	-	-	+	+	+	7.
16	10.	-	-	+	+	+	10.	-	-	+	+	+	7.
17	7.	-	-	-	-	-	7.	-	-	++	+	+	-
18	10.	-	-	+	+	+	7.	-	-	++	++	++	18.
19	10.	-	-	-	-	+	10.	-	-	++	++	++	10.

4. Versuchsreihe:

Humane Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen. Tab.V.
Ein Stamm zeigte in den Nährböden beider Unterreihen kein Wachstum. Diese beiden Nährböden wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Das Wachstum der anderen Stämme war in den Kulturen der Unterreihe L nach durchschnittlich 9,5 Tagen und in der Unterreihe LA nach 7,7 Tagen zu erkennen. Auf PETRAGNANI m.Glyc. das erste Wachstum nach 11,2 Tagen und auf PETRAGNANI o.Glyc. das erste Wachstum nach 15,8 Tagen.

In der Unterreihe L hatte sich die Reaktion aller Nährböden bis zum 16.Tag noch nicht geändert. Das gleiche war am 60.Tag noch bei 6 Kulturen der Fall. Von den übrigen 13 Kulturen hatten 11 bis zur letzten Untersuchung lediglich eine schwache (+) Aciditätszunahme erfahren, während bei einer Kultur die Zunahme stärker (++) und bei einer Kultur stark (+++) war. Auch in der Unterreihe LA ist die Reaktion aller Kulturen bis zum 16.Tag noch unverändert. Gegenüber der Unterreihe L zeigte sich aber hier vom 30.Tage an eine einheitlichere, wenn auch nicht erhebliche Zunahme der Acidität, so daß diese am 60.Tag bei 4 Kulturen als stärker (++) und bei 14 Kulturen als schwach (+) zu bewerten war. Nur bei einer Kultur (Nr.8) war die Reaktion bis zum Schluß gleichbleibend (-).

d) Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

Bei den Hauptversuchen der vorliegenden Arbeit wurden humane und bovine Tuberkelbakterienstämme einmal frisch aus tuberkulös verändertem Material, zum anderen durch Verimpfung von PETRAGNANI-Erstkulturen in 4 Versuchsreihen in LOCKEMANNLösung gezüchtet.

Die 1.Versuchsreihe enthielt bovine Erstkulturen, die frisch aus tuberkulös veränderten Lymphknoten von Schlachtrindern gezüchtet wurden. Die 2.Versuchsreihe enthielt humane Erstkulturen, die frisch aus tuberkulösen Sputen von Menschen gezüchtet wurden. Die 3.Versuchsreihe enthielt bovine Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen. Die 4.Versuchsreihe enthielt humane Subkulturen, angelegt aus PETRAGNANI-Erstkulturen.

Außer der Original-LOCKEMANNLösung, die Glycerin enthält, wurde die LOCKEMANNLösung mit Zusatz von 1% Arabinose zur Züchtung und Differenzierung von Tuberkelbakterien verwendet. Die Differenzierung wurde auf Grund der zeitlich unterschiedlichen Aciditätsänderung des Nährmediums durch den Typus humanus bzw. Typus bovinus vorgenommen.

Die Messung des p_H -Wertes der betrapften LOCKEMANNLösung wurde nach verschiedenen langen Züchtungszeiten auch der unter V.b. angegebenen Methode mit Nitrazingelb vorgenommen. Es werden dabei 2 Tropfen Nitrazingelblösung (1:10000) auf eine Tüpfelschale verbracht und direkt daneben 4-5 Ösen der Kulturflüssigkeit. Durch Überführen der Ösen werden die beiden Flüssigkeiten miteinander in Berührung gebracht. Durch das Hineinfließen der Kulturflüssigkeit in den Indikator zeigt sich an den Berührungsstellen ein Farbumschlag, der das sofortige Ablesen des p_H -Wertes ermöglicht. Die Nitrazingelblösung färbt sich bei p_H 6,0 gelb, bei 6,2 gelbbraunlich, bei 6,3 gelbbraun, bei 6,4 gelbbraun mit olivgrünem Schimmer, bei 6,5 olivgrün, bei 6,6 bis 6,7 grünviolett, bei 6,8 und darüber tiefblauviolett.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse kann festgestellt werden, daß sich in der LOCKEMANNLösung ohne Arabinosezusatz keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Aciditätsänderung bei der

Beimpfung mit humanen und bovinen Tuberkelbakterienstämmen ergeben. Das gilt sowohl für die Kulturen, die frisch aus tuberkulös verändertem Material herausgezüchtet wurden, als auch, und das noch mehr, für die durch Verimpfung von Reinkulturen gezüchteten. Es hatten in diesem Medium beide Typen eine Aciditätsvermehrung hervorgerufen, teilweise war diese aber auch bei beiden nicht zu erkennen. Eine Typendifferenzierung, vorgenommen auf Grund einer unterschiedlichen Änderung der Nährbodenacidität durch den Typus humanus oder Typus bovinus, erscheint mit diesem Nährboden nicht möglich.

Anders liegen die Verhältnisse bei dem Nährboden mit Zusatz von 1% Arabinose. Hier hatten vor allem die aus frischem Material gezüchteten bovinen Stämme der Versuchsreihe 1 bereits am 9. Tage in 18 von 24 Kulturen eine Säuerung des Nährbodens hervorgerufen. Am 16. Tag war die Säuerung, mehr oder weniger stark, bei allen 24 bovinen Kulturen eingetreten und es wurde bei den folgenden Untersuchungen noch in den meisten Fällen eine stark zunehmende Acidität festgestellt.

Dagegen hatte von den aus Sputen gezüchteten humanen Stämmen bis zum 16. Tag noch keiner die Nährbodenreaktion verändert. Erst bei der Untersuchung am 30. Tage zeigte sich eine schwache Säuerung der Nährböden bei 5 Stämmen. Am 44. und 60. Tag war allerdings auch bei den übrigen humanen Erstkulturen eine schwache bzw. stärkere Säuerung der Nährböden nachzuweisen.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die frühere und stärkere Aciditätszunahme der bovinen Erstkulturen, die frisch aus tuberkulösen Rinderlymphknoten gezüchtet wurden, in der Vorbehandlung des Ausgangsmaterials mit Schwefelsäure ihre Erklärung finde und daß trotz der Neutralisation des zu verimpfenden Sediments mit Natronlauge in diesem bei der Verimpfung noch Säureionen vorhanden waren, die diese verstärkte Reaktion bewirkten. Daß die Aciditätszunahme bei den bovinen Kulturen aber nicht allein auf dieser Grundlage beruht, kann durch die Tatsache widerlegt werden, daß die bovinen Subkulturen aus PETRAGNANI-Erstkulturen der 3. Versuchsreihe in LOCKEMANNLösung + Arabinose ebenfalls eine frühere Säuerung bewirkten, als die humanen Subkulturen aus

PETRAGNANI-Erstkulturen der Versuchsreihe 4.

Von diesen bovinen Stämmen hatten am 9.Tag schon 8 Stämme eine Zunahme der Acidität des Nährmediums verursacht, während bis zum 16. Tag alle 17 bovinen Stämme eine Säuerung hervorriefen. Bis zum 60.Tag verstärkte sich die Säuerung der LOCKEMANNLösung. Dagegen hatten von den als Subkulturen gezüchteten humanen Stämmen bis zum 16.Tag noch keiner eine Säuerung des Nährbodens hervorgebracht. Die Säuerung setzte bei diesen humanen Kulturen erst später und schwächer ein und erreichte nicht die Stärke der Säuerung der bovinen Kulturen.

Nach den vorgenommenen Untersuchungen erscheint das in der Arbeit näher beschriebene Verfahren geeignet, eine Typendifferenzierung von humanen und bovinen Tuberkelbakterien in LOCKEMANNLösung mit Zusatz von 1% Arabinose durchzuführen.

E. Schlusssätze.

1. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Differenzierung von humanen und bovinen Tuberkelbakterien LOCKEMANNlösung, die an sich Glycerin enthält, mit einem Zusatz von 1% Arabinose benutzt.
2. Tuberkelbakterien können nach den in vorliegender Arbeit durchgeführten Untersuchungen in dieser Lösung gleichzeitig leicht gezüchtet und differenziert werden.
3. Die Vorbehandlung tuberkulösen Materials, aus dem die Züchtung erfolgen soll, wird mit Trinatriumphosphat nach der von Buchert (2) angegebenen Methode vorgenommen. Eine Verunreinigung des Nährmediums durch Begleitbakterien war bei dieser Methode sehr geringgradig. Sie wurde nur bei einem Nährboden beobachtet.
4. Bei Verwendung von LOCKEMANNlösung mit Zusatz von 1% Arabinose hatten alle frisch gezüchteten bovinen Stämme eine Erhöhung der Nährbodenacidität bis zum 16.Tag nach der Beimpfung hervorgerufen.
5. Die humanen Stämme vermochten in keinem Falle bis zum 16.Tag eine Aciditätserhöhung zu bewirken.
6. Der aufgezeigte Unterschied kann zur Typendifferenzierung herangezogen werden.
7. Zur Feststellung der Sicherheit dieser Ergebnisse sind weitere umfangreichere Untersuchungen am Platze.

Herrn Professor Dr. Hugo K e l l e r danke ich für die Überlassung des Themas und für die ständige Unterstützung bei meiner Arbeit.

Ebenso gebührt den Herren Dr. B u B und Dr. L a n g für ihre stete Hilfsbereitschaft mein aufrichtiger Dank.

F. Literaturverzeichnis.

1. Bozkurt: Versuche zur färberischen Differenzierung von Tuberkelbakterien und apathogenen Mykobakterien. Diss. Gießen 1953.
2. Buchert: Zur Züchtung von Tuberkelbakterien nach Vorbehandlung mit Trinatriumphosphat. Zbl.Bakt. Orig. 161, 371 (1954).
3. B u B Besteht die Möglichkeit der bakterioskopischen Unterscheidung von Tuberkelbakterien und apathogenen Mykobakterien. Der Lebensmitteltierarzt 4,270 (1953).
4. Buß u.Schmitt: Die Nitrazingelblösung als Indikator bei der Säure-Lauge-Titration. Der Lebensmitteltierarzt 5,56 (1954).
5. Gottsacker: Die Kultur des Erregers der Tuberkulose I.Mitt. Ei-Nährböden nach HOHN (Substrat 4) mit einer um 33% verringerten Eimenge und unsere Erfahrungen mit dem SAUTON-Substrat. Zbl.Bakt. Orig. 152, 65 (1947/48).
6. Ders.: Die Kultur des Erregers der Tuberkulose. II.Mitt. Substrat 4 auf SAUTON-Agar. Zbl.Bakt. Orig. 154, 293 (1949).
7. Ders.: Die Kultur des Erregers der Tuberkulose. III.Mitt. Die Bedeutung der Feuchtigkeit und ihre Erhaltung. Zbl.Bakt. Orig. 154, 347 (1949).
8. Ders.: Die Kultur des Erregers der Tuberkulose. IV.Mitt. SAUTON-Substrat mit Zusätzen von Gesamtei und Eigelb. Zbl.Bakt. Orig. 156, 204 (1950/51).
9. Ders.: Die Kultur des Erregers der Tuberkulose. V.Mitt. Die Differenzierung der Typen auf Eigelbnährböden. Zbl.Bakt. Orig. 156, 351 (1950/51)

10. Graack: Beitrag zur Frage der Typendifferenzierung von Tuberkelbakterienstämmen mit Hilfe des Bromkresolpurpurnährbodens nach WAGENER und MITSCHERLICH. Diss. Gießen 1954.
11. Griffith, A.S.: Zit.n.MEYN, Mth.prakt.Thkde.4, 273(1952).
12. Helm: Die Typendifferenzierung der Tuberkelbazillen durch den Kulturversuch nach WOLTERS u. DEHMEL. Zbl.Bakt.Orig. 127, 73 (1933).
13. Henley u.Le Duc: Growth and metabolism of tubercle bacilli. Amer.Rev.of Tb.40, 313 (1939). Zit. n. WAGENER u.MITSCHERLICH.
14. Mutyra-Marek-Manninger: Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. 9.Auflage, Gustav Fischer, Jena 1945, I.Band.
15. Kollé-Hetsch: Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten. 11.Auflage. Urban u.Schwarzenberg, München u.Berlin.
16. Kossel, Weber u. Heuß: Vergleichende Untersuchungen über Tuberkelbazillen verschiedener Herkunft. Tbk.Arb.kaiserl. Gesundheitsamt 1904. Zit.n.MEYER, P. Diss.Gießen 1910.
17. Kunze: Die Eignung des syrischen Goldhamsters als Versuchstier für die Tuberkulose. Diss.Gießen 1950.
18. Kurzweil: Über den Wert des PETRAGNANI-Nährbodens und seiner Modifikation für die Typendifferenzierung der Tuberkelbakterien. Diss.München 1948.
19. Meyer, H.: Diss. Gießen, unveröff.
20. Meyer, P.: Über die Differenzierung der Tuberkelbazillen verschiedener Herkunft auf gallehaltigen Nährböden. Diss. Gießen 1910.
21. Meyn: Nachweis und Typendifferenzierung der Tuberkelbakterien. B.M.T.W. 51/52, 607 (1941).
22. Ders.: Versuche und Erfahrungen mit gebrauchsfertigen Nährböden in der kulturellen Tuberkulosedagnostik. Mth.prakt.Thkde. 4, 273 (1952).

23. Mitscherlich: Die Differenzierung frisch isolierter Stämme von *Mycobacterium tuberc.hominis* und *bovis* in Kultur und Tierversuch. *Zschr.f.Hyg.* 134, 375 (1952).
24. Möllers: Die Tuberkelbazillen. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen KOLLE, KRAUS und UHLENHUTH. III. Auflage, Band V,2 (1928), Verlag Gustav Fischer, Jena und Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien.
25. Müller: Medizinische Mikrobiologie. 1950.
26. Neuhäuser: Über den Wert einer kulturellen Typendifferenzierung von Tuberkelbakterien im Rahmen der praktischen Tuberkulosedagnostik unter Beziehung neuerer Spezialnährböden. Diss. München 1953.
27. Schieck: Zit.n.MÖLLERS, Hdbch.d.path.Mikr.Organ.
28. Schönberg: Die Untersuchung von Tieren stammender Lebensmittel. 6. Auflage (1950), Verlag M. u. H.Schaper, Hannover.
29. Siebert: Zur Biologie der Tuberkelbakterien. *Zbl.Bakt.Orig.* 51, 305 (1909).
30. Smith, Th.: The reaction curve of tubercle bacilli from different sources in bouillon containing different amounts of glycerine. *J.Med.Res.Boston.* 13. Nr. 4 (1905) Zit.n.MEYN.
31. Strehl: Tuberkelbazillenwachstum und Typenbestimmung auf vitaminhaltigen synthetischen Agarnährböden. Diss. Gießen 1940.
32. WAGNER u. MITSCHERLICH: Fortschritte in der Differenzierung der Tuberkelbakterientypen. *Zbl.Bakt.Orig.* 157, 87, (1951/52).

33. Witte: Beitrag zur Züchtung von Tuberkelbakterien unter besonderer Berücksichtigung des Typus bovinus. Zschr.Inf.Krkh.Haust. 48, 14 (1935).
34. Wolters u.Dehmel: Zur Züchtung und Differenzierung der Tuberkelbakterien. Zbl.Bakt.Orig. 117, 412 (1930).

G. Lebenslauf.

Am 22.8.1926 wurde ich als Sohn des Oberschullehrers Richard S c h n e i d e r und seiner Ehefrau Maria, geb. Langsch, in Janowitz/O.S. geboren.

Zu Ostern 1933 trat ich in die Volksschule in Oppeln/O.S. ein und besuchte ab Ostern 1937 daselbst die Moltke-Oberschule. Im Sommer 1943 wurde ich zum Luftwaffenhelferdienst, im Sommer 1944 zum Wehrdienst einberufen. Im Sommer 1945, aus kurzer Kriegsgefangenschaft entlassen, arbeitete ich zunächst in der Landwirtschaft in Bayern. Von dort aus kam ich wieder mit meinen Eltern in Verbindung, die bei Erfurt eine neue Heimat gefunden hatten. An der "Oberschule zur Him- melspforte" in Erfurt nahm ich an einem Sonderlehrgang teil und legte am 7.10.1946 die Reifeprüfung ab. Anschließend war ich wieder in der Landwirtschaft tätig, bis ich im Wintersemester 1948/49 mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Hochschule in Gießen begann. Hier legte ich im Herbst 1950 die Tierärztliche Vorprüfung und im Sommer 1953 die Tierärztliche Prüfung ab. Nach Ableistung des praktischen Halbjahres bei Herrn Dr. F ü s e r in Fulda erhielt ich am 1.3.1954 die Approbation. Im August 1954 begann ich die vorliegende Arbeit im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde in Gießen.

Druck:
Stempel - Kreuter
Gießen